第9卷 增刊
1988年11月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.9, Sup.
Nov., 1988

尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）乳酸脱氢酶同工酶的研究

郑子修* 钟金颜* 丁琳华**

（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

对培养2至7天分六阶段取样的尖尾藻细胞（*Oxyrrhis marina*）进行乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖凝胶电泳分析，结果表明，全部样品中乳酸脱氢酶同工酶均呈现三种不同分子形式的表型特征。随电泳迁移率的增大，由阴极趋于阳极端依次为LDH_3，LDH_2，LDH_1。采用分光光度比色定量法，于波长560nm测得各同工酶组份相对百分含量见表1。LDH_3同工酶在培养2至7天的全过程中酶活性水平始终保持高于LDH_1和LDH_2的水平。在培养第四天出现最高值。

关键词：涡鞭毛虫，尖尾藻，乳酸脱氢酶同工酶，琼脂糖凝胶电泳。

同工酶（Isoenzyme）是指具有相同或相似催化功能但酶分子结构不同的一组酶。它是由染色体上不同的基因位点或同一位点的等位基因所编码。由于不同酶及其同工酶之间底物的差异性和动力学性质的差异，决定了他们在细胞中功能状态的不同。因而对于这类特异性蛋白质的分析研究，有可能将基因活动的状况以直观形式展现出来，是基因的生化表现型（Biochemical phenotype）（Markert & Moller 1959；Markert 1968；Markert *et al.*，1975）。利用同工酶的分析来研究细胞分化及个体发生过程中基因作用的调控与表达（Lindahl & Mayeda 1973；Maclean 1976；Plum & Ringoir 1977；Setchenska & Arnstein 1978），以及对于生物群体的遗传进行规律的探讨已经受到广泛的重视（熊全沫等1985；Markert *et al.*，1975；Vonwyl & Fischberg 1980；Wilson *et al.*，1964），成为当今分子生物学研究领域的重要组成部份。

尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）是一种异养性的在细胞结构上稍高等的涡鞭毛虫类（Dinoflagellate）。这是一类从原核生物进化到高等真核生物过渡类型的单细胞生物（李靖炎1979；Dodge 1964）。它被人们视为研究真核细胞的起源，特别是真核染色体

本研究得到李靖炎研究员的支持和帮助，谨致衷心感谢。

* 现在江西省科学院生物资源研究所
** 现在南京生物化学制药研究所

本文1987年5月11日收到，同年11月26日修回。

起源与进化的的活化石（Living fossil）。以往的工作大都偏重于以显微结构分析与细胞化学方法为主的形态结构上的研究（李靖炎等 1978；Dodge & Crawford 1971）。随着分子生物学的发展，相继也有了一些生化方面的研究，例如对于涡鞭毛虫类的细胞核内染色体蛋白的分析研究报道（孙毓麟等1978；Rizzo & Nooden 1974），但已研究过的蛋白种类是很有限的。对于这类单细胞生物的酶及其同工酶的表型分析及多态性的研究，有助于对物种的起源与进化的探讨和为细胞分化过程中基因活动的作用机理提供分子生物学依据。迄今未见这方面的报道。我们采用琼脂糖凝胶区带电泳方法对2至7天中不同培养天数尖尾藻细胞乳酸脱氢酶同工酶进行了分析与比较，得到一些与高等真核细胞不相一致的结果。现报道如下。

材料和方法

一、材料来源及样品制备

尖尾藻(*Oxyrrhis marina*)为海生异养型单细胞真核生物。从上海细胞生物学研究所及山东海洋学院引种，由昆明动物研究所单细胞生物培养室进行人工增殖培养。分别于培养的第2，3，4，5，6，7天定时取材。经抽样镜检证明确为尖尾藻纯培养物后，于4000rpm（室温下）离心15分钟，收集藻细胞备用。平均每1000毫升悬浮培养物可得到约80～120毫克尖尾藻细胞。

由于尖尾藻属于裸甲藻类，没有坚硬的胞壁结构。我们参照孙毓麟等（1978）分离尖尾藻细胞核所用破壁方法，并作了相应简化。取离心收集的细胞，加入4—5倍量（W/V）的细胞破壁液（0.3M蔗糖，0.025M Tris，0.04M N_aHSO_3，0.005M EDTA，0.01M $MgSO_4$，0.1%Triton X—100，pH7.0—7.4）之后，置冰浴中充份振荡，镜检证明有效破壁率达到95%以上为宜。于10,000rpm离心15分钟（0—8℃），取上清液供当日备用。

二、同工酶的电泳分离

乳酸脱氢酶同工酶电泳分离，凝胶制备及其同工酶显色均按本实验室既定方法操作。取0.5克琼脂糖（Agrose，上海东海制药厂，电泳纯）溶解于50毫升0.06M巴比妥钠—盐酸缓冲液，pH8.6，48毫升蒸馏水，2毫升10mM乙二胺四乙酸二钠溶液中制成0.5%电泳凝胶。于载玻片上制备薄层凝胶板供电泳使用。采用自制水平式电泳槽，Dy—74 I型恒流稳压电泳仪，电压150伏，电流60—70毫安，电泳40分钟。电泳缓冲液为0.06M巴比妥钠—盐酸缓冲液，pH8.6 $\mu=0.06$。一次上样量为15微升。室温在20℃以上时需注意降温冷却措施。

三、同工酶显色

乳酸脱氢酶同工酶显色液按每块凝胶板用量进行配比。显色液组成包括1M乳酸钠溶液（需用0.1M磷酸缓冲液配制pH7.4）0.1毫升，氧化型辅酶Ⅰ（NAD）0.25毫克，

氯化硝基四氮唑兰（NBT）0.30毫克，吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）0.05毫克，均需用蒸馏水溶解配制。显色液新鲜配用为宜。使用时加入琼脂糖电泳凝胶0.5毫升。于凝胶板表面均匀覆盖同工酶显色液，置37°—40°C孵育45分钟。待显示兰紫色LDH同工酶区带后，用乙醇—水—冰醋酸（48—48—4毫升）溶液固定30分钟，再用蒸馏水充份漂洗脱去残色后同工酶区带清晰可见。

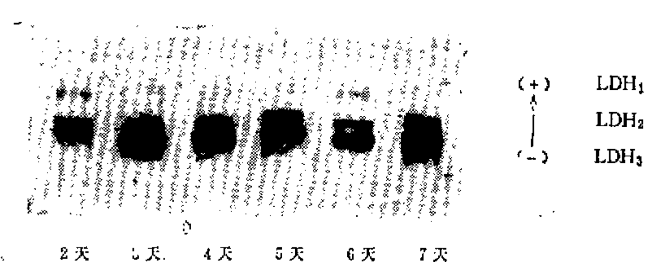
四、同工酶定量与扫描

尖尾藻乳酸脱氢酶不同分子形式同工酶随电泳迁移率的增大，由阴极向阳极端分布为三条明显区带，依次为LDH_3，LDH_2，LDH_1，按序切割各区带，另以阴极端空白凝胶切割同等大小为空白对照样品。分别洗脱于0.4*N* NaOH洗脱液中。采用分光光度比色定量法，于560nm波长分别测定吸光值，计算出各同工酶组份的相对百分活性。另取显色漂洗后的电泳凝胶板干燥处理后进行照相记录。并于日本岛津CS—910型双波薄层色谱扫描仪（Shimadzu dual-wavelength chromatogram scanner model CS-910, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan）进行透射直线式光密度扫描记录。样品波长（λ_1）570nm，参考波长（λ_2）500nm，扫描速度为20mm/分钟。

结　果

一、Markert和Moller（1959）应用区带电泳技术成功地对牛心肌乳酸脱氢酶同工酶不同分子形式进行有效分离以来，大量事实表明区带电泳方法已被广泛应用于酶及其同工酶的分析与研究（Rosalki 1974）。我们采用琼脂糖凝胶电泳方法对培养2至7天不同阶段尖尾藻细胞乳酸脱氢酶同工酶进行电泳分析。在分别培养2，3，4，5，6，7天六次取样分析结果，均呈现三条明显的同工酶区带。随电泳迁移率的增大由阴极趋于阳极端，依次为LDH_3，LDH_2，LDH_1（图1、2。）。由于三种不同分子形式同工酶在一级结构上的差异及其等电点的不同，而不同亚基间所带电荷性质与数量也有所不同，因而，导致他们在pH8.6碱性缓冲系统中和特点电场作用下产生有效的分离。按照三种同工酶区带电场中明显趋于阳极端的一致性，表明尖尾藻乳酸脱氢酶的三种不同分子形式同工酶的等电点应约在pH7.0以下。

二、对尖尾藻细胞乳酸脱氢酶各同工酶组份进行洗脱定量分析，采用分光光度比色定量法，分别测得各同工酶组份的相对百分活性，统计其平均值及个体值变动范围列于表1。分析结果表明，在培养3，4，5，6，7天五个阶段取材的尖尾藻其同工酶表型均呈现以LDH_3同工酶活性为最高的酶谱特征。其中在培养5天和7天时表现明显的以LDH_3同工酶活性为最高，而LDH_1同工酶活性为最低的酶谱特征$LDH_3 > LDH_2 > LDH_1$。在培养3天，4天和6天的三个阶段样品却表现出LDH_1同工酶活性的回升，而呈现为$LDH_3 > LDH_1 > LDH_2$的酶谱特征。

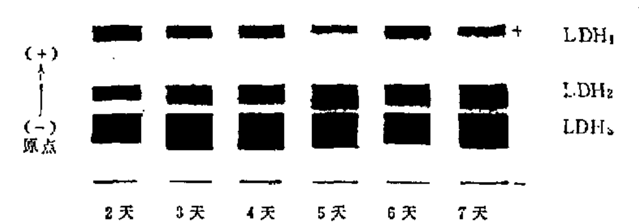


2天 3天 4天 5天 6天 7天

(2 days) (3 days) (4 days) (5 days) (6 days) (7 days)

图1 培养2至7天不同生长期的尖尾藻细胞乳酸脱氢酶同工酶的琼脂糖凝胶电泳图谱。

Figure 1. Electrophoretic patterns on agarose gel thin layer of lactate dehydrogenase isoenzymes during different periods cultured from two to seven days in the dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*.



2 days 3 days 4 days 5 days 6 days 7 days

图2 培养2至7天不同生长期的尖尾藻细胞乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱的线型图。

Figure 2. Linear pictures of lactate dehydrogenase isoenzymic electropherograms during different periods cultured from two to seven days in the *Oxyrrhis marina*.

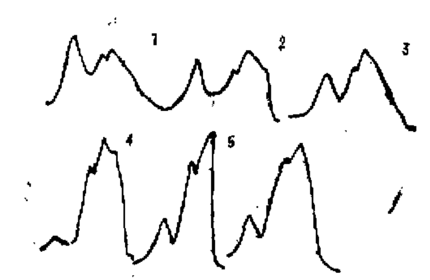


图3 培养2至7天不同生长期的尖尾藻细胞乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱的扫描曲线。样品波长（λ_s）为570nm，参考波长（λ_r）为500nm，扫描速度为20mm/分钟。图中（1）二天，（2）三天，（3）四天，（4）五天，（5）六天，（6）七天。

Figure 3. Scanning curves of lactate dehydrogenase isoenzymic electropherograms during different periods cultured from two to seven days in the *Oxyrrhis marina*.

$\lambda_s = 570$nm, $\lambda_r = 500$nm, scanning speed for 20 mm/min.

(Note: in figure 3, (1) two days, (2) three days, (3) four days, (4) five days, (5) six days, (6) seven days.)

表1　培养2至7天不同生长期的尖尾藻细胞乳酸脱氢酶三种同工酶的活力变化及组成分析

Table 1. Composition and activity changes of three isoenzymes of lactate dehydrogenase during different periods cultured from two to seven days in the dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*.

培养天数 days of culture	样品数 No. of specimen	平均值±标准差 % Percentage of mean values±standard deviation						同工酶活力大小顺序 order of isoenzymes activtiy
		LDH_1		LDH_2		LDH_3		
		$\overline{X}$±S.D.	范围 range	$\overline{X}$±S.D.	范围 range	$\overline{X}$±S.D.	范围 range	
2天 two days	15	31.6±4.7	24.3—40.0	34.5±6.2	25.4—44.4	33.9±5.4	20.0—45.6	$LDH_2>LDH_3>LDH_1$
3天 three days	14	27.0±5.7	19.2—35.3	23.2±4.5	14.5—30.6	49.8±8.8	37.6—66.3	$LDH_3>LDH_1>LDH_2$
4天 four days	15	25.5±4.1	17.5—33.3	21.9±3.1	15.9—27.0	52.6±4.9	43.5—60.3	$LDH_3>LDH_1>LDH_2$
5天 five days	12	20.3±3.4	16.8—26.2	29.7±3.6	24.2—34.0	50.0±6.6	40.0—58.9	$LDH_3>LDH_2>LDH_1$
6天 six days	15	27.4±4.6	21.3—32.7	24.2±3.6	18.2—29.3	48.3±2.8	44.1—53.1	$LDH_3>LDH_1>LDH_2$
7天 seven days	12	21.4±4.6	15.3—31.0	31.3±3.2	26.5—36.8	47.2±4.5	36.2±54.9	$LDH_3>LDH_2>LDH_1$

三、在图4中分别比较了尖尾藻细胞三种不同分子形式同工酶的相对百分活性在2至7天不同培养时期中的消长变化。结果表明尖尾藻乳酸脱氢酶的三种分子形式同工酶在培养的第2天时酶活性水平基本趋于一致，其相对百分活性依次为31.6%，34.5%，33.9%。而在培养的第3天开始LDH_1和LDH_2同工酶的活性同时趋于下降，并相继持续波动在20—30%的变化区间，直至培养的第7天。比较突出的是LDH_3同工酶，从培养的第2天开始酶活性水平便出现持续升高，直至第4天达到最高值其相对百分活性为52.6%。尽管在相继第5天，6天和第7天三阶段中其相对酶活性依次递减为50.0%，48.3%，47.2%。但就培养2至7天的全部样品中LDH_3同工酶的相对百分活性始终持续高于LDH_1和LDH_2同工酶的水平（图4）。

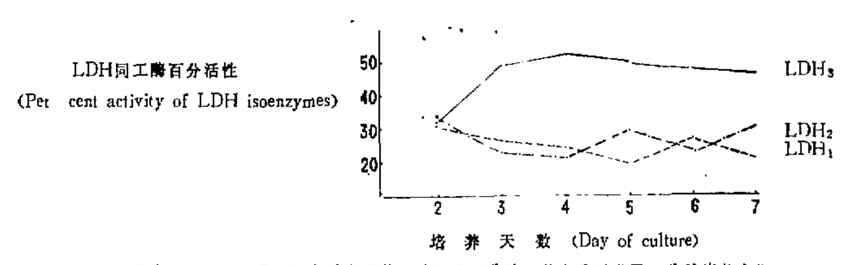


图4 培养2至7天不同生长期的尖尾藻细胞乳酸脱氢酶三种分子形式同工酶的消长变化。

Figurs 4 Changes of increase-decrease of three isoenzymic activity of lactate dehydrogenase during different periods cultured from two to seven days in the *Oxyrrhis marina*.

讨 论

一、乳酸脱氢酶同工酶是遗传差异产生的多酶形式，是由遗传基因所决定的一级结构不相同的多种形式的大分子成份。尖尾藻细胞在七天连续增殖培养过程中，在六个不同阶段的电泳分析结果均呈现为三种分子形式的酶谱特征。尽管在不同时期的样品中LDH_1，LDH_2和LDH_3同工酶的相对百分活性有所不同（表1），但在只呈现三种同工酶形式这点上却仍然是高度一致的。结果提示，尖尾藻细胞乳酸脱氢酶在pH8.6碱性缓冲系统中的琼脂糖凝胶电泳表现为三种不同分子形式同工酶，可设想为分别由A基因和B基因所编码的二条多肽链按一定比例杂合而成的二聚体结构。其同工酶的三种分子形式应为A_2，A_1B_1，B_2。这一点与大多数高等真核细胞中所见到的五种分子形式的四聚体结构（A_4，A_3B，A_2B_2，AB_3，B_4）是显然不同的。我们在同等实验条件下，分别对大白鼠，树鼩，猕猴等高等真核生物血清和组织的LDH同工酶进行琼脂糖凝胶电泳分析，结果均与四聚体结构相一致（郑子修和钟金颜，1987）。分子生物学研究表明，同工酶的分子构象受基因所控制，而不同物种的不同分子形式同工酶活性部位的氨基酸序列通常是高度保守的。因而对于不同物种和同一物种的不同组织以至个体发生中的不同阶段，LDH同工酶的数量和活性也存在较大差异，通常表现出明显的种属特异性和组织器官特异性（Markert&Ursprung 1962; Schwantcs 1973; Vonwyl&Fischberg

1980）。

二、尖尾藻是一种由原核生物进化到高等真核生物过渡类型的低等单细胞真核生物。从生物进化系统上却远较其它高等真核生物原始。而后者大都具有自身完善而功能特化的器官与组织。象尖尾藻这样一类单细胞生物，其单个独立的细胞单元就已构成一个完整的生命个体。在长期自然选择与适应的过程中，选择性地特化某些与其自身维持正常生命活动及其种系繁衍相适应的生理功能与代谢特征，也是维持生命和种系进化的必要条件。糖代谢是维持细胞正常生命活动的重要环节，乳酸脱氢酶同工酶是细胞糖代谢中具有极其重要意义的氧化还原酶。在配合细胞正常生命活动的长期适应性变化过程中，产生相应的改变与调整是具有重要生物学意义的。图4所反映出的尖尾藻三种分子形式同工酶在培养2至7天中相对百分活性的消长变化，明显地表现出细胞在增殖过程中，是以无氧酵解占优势的代谢方式担负着完成细胞生命活动所必需的能量转化。细胞内乳酸脱氢酶同工酶呈现以A基因占优势的LDH_3型同工酶活性为最高的酶谱特征。

三、细胞学和细胞化学研究表明，涡鞭毛虫类与典型的真核生物之间的区别，主要在于前者的染色体在整个细胞周期中始终保持着致密状态，其染色体具有介于原核生物染色质结构与真核生物的典型染色体之间的过渡性质（李靖炎等1978；Dodge&Crawford 1971）。同时已知高等真核生物的染色质亚单位结构是由五种组蛋白（H_1，H_3，H_{2a}，H_{2b}，H_4）和DNA结合形成的复合体。但在尖尾藻上，通过生物化学和细胞化学方法已经证实，其细胞核内的碱性蛋白只是一种电泳迁移率，近似于高等真核细胞内组蛋白H_4的组份（李靖炎等1978；孙毓麟等1978）。看来尖尾藻的这些与高等真核细胞之间所呈现的差异，并非是孤立的偶然的。这是否与物种处于不同进化阶梯上种的特异性表现有关，是值得探索与研究的课题。

参考文献

李靖炎　1979　细胞在生命进化历史中的发生——真核细胞的起源。P.40—58，科学出版社。

李靖炎　陈向虹　乔以炯　1978　尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）染色体碱性蛋白的细胞化学检查。实验生物学报 11：303—308。

郑子修　钟金颜　1987　树鼩血清乳酸脱氢酶同工酶的研究。兽类学报　7（3）：18—188。

熊全沫　夏盛林　1985　中国鲷脂鱼同工酶的研究。动物学报　31：20—27。

孙毓麟　范佩芳　商伟明　1978　尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）染色质酸溶性蛋白质的分析。实验生物学报 11：297—302。

Dodge, J. D. 1964 Chromosome structure in the Dinophyceae. II. cytochemical studies. *Arch. Mikrobiol.* 48:66—80.

Dodge, J. D. and R. M. Crawford 1971 Fine structure of the Dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*. I. the general structure of the cell. *Protistologica* 7:295—304.

Lindahl, R. and K. Mayeda 1973 Lactate dehydrogenase isoenzymes of the mogolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. ontogeny and relative isoenzymes composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 45 (*B*): 265—273.

Maclean, N.1976 *Control of gene expression* p.41—53, Academic press, London.

Markert, C.L. and F.Moller 1959 Multiple forms of enzymes: tissues, ontigenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.* 45:753—763.

Markert, C.L. and H. Ursprung 1962 The ontogeny of isoenzyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Devel. Biol.* 5:363—381.

Markert, C.L. 1968 The molecular basis for isozymes. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 151:14—40.

Markert, C.L. , J.B.Shaklee and G.S. Whitt 1975 Evolution of a gene:multiple genes for LDH isoenzymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science.* 189:102—114.

Plum, J. and S.Ringoir 1977 Lactate dehydrogenase isoenzymes patterns as a measure of cellular differentiation in lymphocytic cells. *J.Reticuloendothelial Soc.* 21:225—230.

Rizzo, P.J. and L.D.Nooden 1974 Partial characterization dinoflagellate chromosomal proteins *Biochim. Biophys. Acta* 349:415—427.

Rosalki, S.B.1974 Standardisation of isoenzyme assays with special reference to lactate dehydrogenase isoenzyme electrophoresis. *Clin. Biochem.* 7:29—40.

Schwantes, M.L. 1973 Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns of thirteen species of snakes. *J.Exp.Zool.* 185:311—316.

Setchenska, M.S. and H.R.V.Arnstein 1978 Changes in the lactate dehydrogenase isoenzyme pattern during diffrentiation of rabbit bone marrow erythroid cells. *Biochem.* J. 170:193—201.

Vonwyl, E. and M.Fischberg 1980 Lactate dehydrogenase isoenzymes in the genus xenopus: species—specific patterns.

Wilson, A.C. , N.O.Kaplan, L.Levine, A.Peste, M.Reichlin and W.S.Allison 1964 Evolution of lactate dehydrogenase. *Fed. Proc.* 23:1258—1266.

STUDIES ON LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES OF THE MARINE DINOFLAGELLATE(*OXYRRHIS MARINA*): AN ANALYSIS BY AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

Zheng Zixiu, Zhong Jinyan, Ding Linhua

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The glycolytic enzyme lactate dehydrogenase(LDH, EC 1. 1. 1.27), which catalyzes the reversible conversion of pyruvate to lactate and occurs in virtually all tissues, exists in multiple molecular forms called isoenzymes. Lactate dehydrogenase isoenzymes has been extensively studied in invertebrates and vertebrates.

The dinoflagellate are a group lower eukaryotic algae possessing a number of unique cellular properties. It is one of the most suitable biological material for the study of origin and evolution from prokaryotes to eukaryotes. In the present study, the changes of lactate dehydrogenase isoenzymes during different periods of cultured 2 to 7 days in the dinoflagellate, *Oxyrrhis marina* were analysed by agarose gel electrophoresis. The algae cells were collected by centrifugation at 4000 rpm for 15 min and then lysed with the lysing solution containing 0.3*M* sucrose, 0.025*M* trihydroxymethylamino, 0.04*M* N_aHSO_3, 0.005*M* ethylenediamine tetraactic acid, 0.01*M* $MgSO_4$ and 0.1% Triton X-100, pH 7.0—7.4. The lysate was centrifuged at 10000 rpm (0°—8°C) for 15 min remove cell debris and nuclei and then supernatant was electrophoresis performed on 0.5% agarose gel thin layer in a pH 8.6 buffer containing 0.06*M* sodium diethylbarbiturate and 0.2N hydrochloric acid. The LDH isoenzymic activity in agarose gel was visualized with a staining solution consisting of sodium DL-lactate, Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), N-methylphenazinium methylsulphate (PMS) and nitro-tetrazolium blue chloride (NBT). The gel was incubated at 37°-40°C for 40 min. The isoenzymic bands were excised from agarose gel and eluted. The electropherograms of lactate dehydrogenase isoenzymes was scanned record by SHIMADZU dual-wavelength chromatogram scanner model CS-910 at $\lambda_s = 570$ nm, $\lambda_r = 500$ nm and scanning speed

for 20mm/min.

The results were as follows: (1) The isoenzymic phenotypes of three different molecular forms was observed in 2 to 7 days cultures of *Oxyrrhis marina*. Different bands are referred to as LDH_1, LDH_2 and LDH_3 in order of relative mobility towards the anode at alkaline buffer. LDH_1 is the fastest and LDH_3 the slowest. (2) The percentage of mean values of different culture periods isoenzymes 1 to 3 components is 31.6, 34.5, 33.9(two days); 27.0, 23.2, 49.8 (three days); 25.5, 21.9, 52.6 (four days); 20.3, 29.7, 50.0 (five days); 27.4, 24.2, 48.3(six days) and 21.4, 31.3, 47.2(seven days), respectively. (3) In cultures of two days, the order of three isoenzymic activity was $LDH_2 > LDH_3 > LDH_1$. In cultures of three, four and six days $LDH_3 > LDH_1 > LDH_2$. In cultures of five and seven days was $LDH_3 > LDH_2 > LDH_1$. (4) Alterations of increase-decrease of three isoenzymic activity of lactate dehydrogenase was in the figure four during different periods cultured from two to seven days in the *Oxyrrhis marina*.

Key Mords: Dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*,
Lactate dehydrogenase isoenzyme,
Agarose gel electrophoresis.

Present address: Institute of Biological Resources,
Jiangxi Academy of Sciences.